

PENETAPAN VITAMIN YANG LARUT DALAM LEMAK DENGAN KROMATOGRAFI CAIR TEKINAN TINGGI (KCTT)

The Analysis of Fat Soluble Vitamins by High Pressure Liquid Chromatography

Effendy De Lux Putra¹, Achmad Mustofa Fatah²
dan Ibnu Gholib Gandjar²,

Program Studi Ilmu Farmasi
Fakultas Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

Qualitative and quantitative analysis of Fat soluble vitamins (vitamin A-palmitate, D2, E-acetate, and K) in Multivitamin powder have been performed by High Pressure Liquid Chromatography.

The fat soluble vitamins were analysed by using Li-Chrosorb RP-8 column and UV-Spectrophotometer detector ($\lambda = 270 \text{ nm}$). The following mobile phase was employed: methanol, methanol-ethanol mixture (5:2), and methanol-water mixture (95:5).

The result indicated that the analysis using methanol as mobile phase (1 ml/minute) gave 3 peaks identified as vitamin K, D2, and E-acetate, with 12 minutes time of analysis. A mixture of methanol-ethanol (5:2) as the mobile phase (1 ml/minute) gave 2 peaks identified as vitamin K and a mixture consisting of vitamin D2 and E-acetate, the time of analysis was 6 minutes. A mixture of methanol-water (95:5), on the other hand, could satisfactorily separate vitamin K, D2, E-acetate, and A-palmitate within 10 minutes.

It can be concluded that methanol-water mixture is the best mobile phase for separation fat soluble vitamins.

The result of the application of this method to multivitamin powder gave (%): vitamin K ($93,00 \pm 5,13$); vitamin D2 ($93,33 \pm 6,07$); vitamin E-acetate ($92,68 \pm 4,78$) and vitamin A-palmitate ($91,12 \pm 6,41$), calculated to the true value.

Key words: fat soluble vitamins – high pressure liquid chromatography - mobilephase

1: Fakultas Matematika dan IPA Universitas Sumatra Utara Medan

2: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

PENGANTAR

Latar belakang

Seiring dengan perkembangan sains dewasa ini bidang medis pun mengalami kemajuan pesat. Hal ini ditandai dengan penemuan berbagai jenis penyakit beserta sebab-sebab dan cara-cara penyembuhannya. Perkembangan ini tentu sangat besar artinya bagi kehidupan masyarakat. Menurut Robinson dan Lawler (1982) vitamin dibutuhkan tubuh untuk mempertahankan kesehatan dan kegunaannya untuk penyembuhan penyakit defisiensi. Menurut Vanderveen dan Vanderveen (1980) dalam usaha memperbaiki defisiensi satu macam vitamin biasanya diperlukan tambahan vitamin lainnya, sehingga terapi dengan multivitamin selalu rasional. Menurut Hashmi (1973) di dalam sediaan multivitamin diketahui beberapa vitamin kehilangan potensinya selama penyimpanan, walaupun kebanyakan dari vitamin tersebut stabil dan dapat dibuat menjadi suatu bentuk sediaan yang lebih stabil terutama bila tidak tercampur dengan vitamin yang lain. Ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi ketidakstabilan vitamin di dalam sediaan multivitamin, yaitu: (i) pH dari medium, (ii) adanya logam-logam tertentu seperti Fe, Cu, Ca, dan antioksidan, bahan pengikat logam, protein, asam amino dan lain-lain, (iii) Sifat dasar dan kadar air yang terdapat di dalam sediaan, (iv) Kondisi pada waktu penyimpanan seperti wadah, cahaya dan suhu, (v) Ketidaksesuaian vitamin-vitamin itu sendiri. Faktor-faktor di atas akan menimbulkan banyak gangguan pada penetapan kadar setiap vitamin di dalam sediaan multivitamin. Dengan bertambah luasnya penggunaan vitamin dan adanya peraturan tentang obat dan bahan makanan di berbagai negara, maka diperlukan suatu metode yang dipercaya dan cepat untuk analisis vitamin yang terdapat di dalam sediaan multivitamin.

Hashmi (1973) telah melakukan penetapan vitamin A, D dan E dengan kromatografi lapisan tipis dengan prosedur sebagai berikut: vitamin A, D dan E dipisahkan dari sediaan multivitamin dengan teknik kromatografi lapisan tipis; vitamin D dielusi dari adsorben dan ditentukan kadarnya secara Colorimetri sedangkan vitamin A dan E ditentukan kadarnya dengan mengukur luas area. La-Roche (1970) telah melakukan penetapan kadar vitamin larut dalam lemak yang terdapat di dalam sediaan multivitamin dengan cara terpisahkan, antara lain: penetapan vitamin A secara Colorimetri dengan metode Carr-Price, pemisahan vitamin D secara kromatografi lapisan tipis dan penetapannya secara Colorimetri dengan antimon triklorida, pemisahan vitamin A dan vitamin E-asetat secara kromatografi sedangkan penetapan vitamin E asetat secara Colorimetri dengan metode Emmerie-Engel.

Baik Hashmi maupun La-Roche tidak menggunakan metode KCTT dalam penetapan kadar vitamin yang larut dalam lemak yang terdapat di dalam sediaan multivitamin. Oleh karena itu di dalam penelitian ini digunakan KCTT. Dolan *et al.* (1978) telah melakukan penetapan vitamin A, D₂ dan E dengan metode KCTT aliran kontinu otomatis; namun dalam penelitiannya Dolan tidak menganalisis vitamin K. Di dalam penelitian ini dilakukan penetapan vitamin A, D₂, E dan K.

Tinjauan Teori

Kromatografi cair tekanan tinggi meskipun usianya masih relatif muda namun telah mampu memberi sumbangan yang sangat berarti pada analisis bahan farmasetika, biokimia, klinis maupun lingkungan. Dalam KCTT kondisi operasi selalu terkontrol dengan teliti. Kolom dapat digunakan berkali-kali dan sampel yang diinjeksikan ke dalam KCTT dipisahkan dan selanjutnya dideteksi oleh detektor yang sensitif, sinyal dari detektor dicatat pada rekorder berupa puncak-puncak kromatogram (Done dkk, 1974). Banyak kelebihan yang dimiliki oleh metode KCTT jika dibandingkan dengan metode lainnya seperti mampu memisahkan molekul ionik dan nonionik secara bersama-sama, kecepatan analisis dan sensitivitasnya tinggi serta dapat dihindari terjadinya dekomposisi/kerusakan bahan yang dianalisis (Hamilton dan Sewell, 1982; Snyder dan Kirkland, 1979; Johnson dan Stevenson, 1978:8).

CARA PENELITIAN

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan sebagai pelarut adalah n heksan (E. Merck); bahan yang digunakan sebagai fasa gerak adalah awuades (dibuat di Laboratorium), metanol (E. Merck), etanol (E. Merck); Bahan yang digunakan sebagai standar adalah vitamin A palmitat (Merck Germany), vitamin D₂ (Merck Germany), vitamin E asetat (Merck Germany) dan vitamin K (Merck Germany). Bahan yang diteliti adalah serbuk multivitamin; Bahan yang digunakan untuk pembuatan serbuk multivitamin adalah vitamin B₁ (Roche Switzerland), vitamin B₂ (Roche Switzerland), vitamin B₆ (Merck Germany), vitamin B₁₂ (Roussel Uclaf. France), vitamin C (Merck Germany), nikotinamida (Roche Switzerland), asam folat (Fx. Kongo Japan), vitamin A palmitat (Merck Germany), vitamin D₂ (Merck Germany), vitamin E asetat (Merck Germany), vitamin K (Merck Germany), Mg. Stearat (Pharmaceutical Grade), Talcum (Pharmaceutical Grade), amilum (Pharmaceutical Grade), Sacharum Lactis (Pharmaceutical Grade).

Alat utama yang dipakai dalam penelitian ini meliputi Simple Liquid Chromatograph System S-1 yang terdiri dari sebuah pompa LC-6A dan sebuah detektor SPD-6A u.v-Spectrophotometric (Shimadzu Co.); Chromatopac C-R3A (Shimadzu Co.); FDD & Screen (Shimadzu Co.); Kolom LiChrosorb RP-8 (10 µm; 4,0 mm x 25 cm; E. Merck); Kertas saring Whatman No. 41 (E. Merck); Mille HV Filter (Millipore Co.); Timbangan Elektronik *Reading Balance* (Shimadzu Co.); Ultrasonic Type USR 3 No. 8536278 (West Germany); (Labu takar, Erlenmeyer, beker gelas, gelas ukur, pipet ukur, pipet volume, indikator universal bertanda E. Merck).

Jalannya penelitian

Pembuatan serbuk multivitamin. Setiap 150 mg serbuk multivitamin mengandung: vitamin B₁ 1 mg; vitamin B₂ 0,7 mg; vitamin B₆ 0,6 mg; vitamin

B₁₂ 0,5 mg; vitamin C 25 mg; nikotinamida 15 mg; asam folat 0,5 mg; Ca. Pantotenat 5 mg; vitamin A palmitat 14 mg; vitamin D₂ 0,5 mg; vitamin E asetat 30 mg dan Sacharum Lactis 22,2 mg.

Untuk penimbangan semua bahan dikali dengan 500. Semua bahan berkhasiat setelah digerus sampai homogen di dalam mortir kemudian secara berurutan sedikit demi sedikit ditambahkan Mg. Stearat, talcum, amilum dan sacharum lactis sambil digerus sampai semua bahan habis ditambahkan. Setelah itu dikeringkan di-oven. Standar serbuk multivitamin dikerjakan dengan cara yang sama seperti di atas tapi jumlah yang ditimbang 50 kali lebih banyak.

Setelah serbuk multivitamin dibuat, kemudian dilakukan hal-hal sebagai berikut.

1. Membuat larutan percobaan masing-masing vitamin dan campuran beberapa vitamin.
2. Membuat fase gerak yang divariasi sebagai berikut: (a) metanol; (b) campuran metanol-etanol (5:2); (c) campuran metanol- air (95:5).
3. Menginjeksikan larutan ke dalam KCTT dengan fasa gerak yang dipilih.
4. Dari cara 3 dapat diketahui fasa gerak dalam perbandingan mana yang dapat memisahkan dengan baik campuran beberapa vitamin. Fasa gerak dengan perbandingan tertentu inilah yang digunakan untuk analisis sediaan serbuk multivitamin.
5. Hasil pemisahan vitamin dideteksi dengan detektor UV-Spektrofotometer pada panjang gelombang = 270 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis dengan fasa gerak metanol, kecepatan alir 1 ml/menit dapat dipisahkan 3 vitamin berturut-turut vitamin K, D₂ dan E asetat; waktu analisis 12 menit (tabel 1).

Tabel 1. Data waktu retensi pemisahan 3 vitamin dengan fasa gerak metanol (1 ml/menit)

Nomor	Nama	Waktu retensi (menit)
1.	Vitamin K	1,625
2.	Vitamin D ₂	2,650
3.	Vitamin E asetat	3,192

Analisis dengan fase gerak campuran metanol-etanol (5:2), kecepatan alir 1 ml/menit dapat dipisahkan 2 vitamin berturut-turut vitamin K, sedang-

kan D₂ dan E asetat bergabung dalam 1 puncak, waktu analisis 6 menit (lihat tabel 2).

Tabel 2. Data waktu retensi pemisahan 3 vitamin dengan fasa gerak campuran metanol-etanol (5:2), kecepatan alir 1 ml/menit.

Nomor	Nama	Waktu retensi (menit)
1.	Vitamin K	1,717
2.	Vitamin D ₂	3,067
3.	Vitamin E asetat	3,067

Analisis dengan fasa gerak campuran metanol-air (95:5) kecepatan alir 1 ml/menit dapat dipisahkan 4 vitamin berturut-turut vitamin K, D₂, E asetat dan A-palmitat; waktu analisis 10 menit (tabel 3).

Tabel 3. Data waktu retensi pemisahan 4 vitamin dengan fasa gerak campuran metanol-air (95:5), kecepatan alir 1 ml/menit.

Nomor	Nama	Waktu retensi (menit)
1.	Vitamin K	2,783
2.	Vitamin D ₂	4,675
3.	Vitamin E asetat	6,092
4.	Vitamin A palmitat	8,658

Dari hasil penelitian di atas dapat disimpulkan bahwa untuk pemisahan terbaik vitamin yang larut dalam lemak dapat digunakan fasa gerak campuran metanol-air (95:5).

Analisis sediaan serbuk multivitamin dengan fasa gerak campuran metanol-air (95:5), kecepatan alir 1 ml/menit dilakukan sebagai berikut: Timbang lebih kurang 150 mg serbuk multivitamin masukkan ke dalam labu takar 10 ml tambahkan n heksan sampai garis tanda kemudian kocok kuat-kuat selama 5 menit, saring dengan kertas saring Whatman. Filtrat ditempatkan pada alat Ultrasonic selama 10 menit, kemudian saring dengan Millex HV-Filter dan injeksikan 10 ul ke dalam KCTT. Injeksi dilakukan 7 kali dari 7 larutan hasil ekstraksi serbuk multivitamin. Waktu analisis 10 menit dan hasil perhitungan perolehan kembali dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Data perhitungan perolehan kembali setiap vitamin dalam serbuk multivitamin yang dianalisis dengan campuran metanol-air (95:5)

No.	Nama	Berat yang ditimbang (mg)	Perolehan kembali dalam:					
			(mg)			(%)		
			\bar{X}	\pm	SD	\bar{X}	\pm	SD
1.	Vit. K	0,50	0,47	\pm	0,03	93,00	\pm 5,13	
2.	Vit. D ₂	0,50	0,47	\pm	0,03	93,33	\pm 6,07	
3.	Vit. E-aset.	30,00	27,79	\pm	1,40	92,58	\pm 4,78	
4.	Vit. A-palm.	14,00	12,76	\pm	0,90	91,12	\pm 6,41	

Analisis campuran 3 vitamin larut dalam lemak dengan fasa gerak metanol memberikan 3 puncak berturut-turut vitamin K, D₂ dan E asetat dengan waktu analisis 12 menit; sedangkan analisis dengan fasa gerak campuran metanol-etanol (5:2) memberikan 2 puncak dengan urutan vitamin K sebagai puncak pertama dan puncak kedua merupakan gabungan vitamin D₂ dan E asetat dengan waktu analisis 6 menit. Perbedaan waktu di atas dapat dijelaskan sebagai berikut: fasa gerak campuran metanol-etanol (5:2) merupakan fasa gerak yang lebih kuat daripada fasa gerak metanol. Fasa gerak yang lebih kuat akan mempunyai harga k' yang lebih kecil atau kapasitas sampel terhadap fasa diam menurun sedangkan terhadap fasa gerak menaik, sehingga waktu analisis menjadi lebih singkat. Analisis campuran 4 vitamin dengan fasa gerak campuran metanol-air (95:5) memberikan 4 puncak berturut-turut vitamin K, D₂, E asetat dan A palmitat dengan waktu analisis 10 menit. Hasil perhitungan perolehan kembali setiap vitamin di dalam serbuk multivitamin (tabel 4) ternyata kadar setiap vitamin berkisar di antara 91,0 dan 94,0%. Jika dibandingkan dengan persyaratan resmi yaitu kadar berkisar antara 90,0 dan 110,0 % maka setiap vitamin di dalam sediaan serbuk multivitamin masih memenuhi persyaratan.

Jika dibandingkan dengan hasil penelitian Dolan *et al* (1978) yang menggunakan kolom LDC (5 μ m; 25 cm x 4,6 mm) fasa gerak campuran metanol-air (95:5), kecepatan alir 3,5 ml/menit diperoleh pemisahan dengan urutan vitamin A asetat, D₂, E asetat dan A palmitat; sedang dalam penelitian ini digunakan kolom LiChrosorb RP-8 (10 μ m; 25 cm x 4,0 mm), fasa gerak campuran metanol-air (95:5) dan kecepatan alir 1 ml/menit dihasilkan urutan pemisahan yang sama yaitu vitamin K, D₂, E asetat dan A palmitat. Dolan tidak meneliti vitamin K dalam penelitiannya. Dari kedua jenis penelitian ini dapat diketahui bahwa perbedaan jenis dan ukuran partikel pengisi kolom akan menyebabkan perbedaan waktu retensi setiap vitamin yang dianalisis serta waktu analisis yang dibutuhkan. Perbedaan lain dari penelitian ini dengan yang pernah dikerjakan oleh Dolan adalah waktu analisis. Dolan memerlukan waktu 6 menit untuk memisahkan 4 macam vitamin (A asetat, D₂, E asetat dan A palmitat) dengan kecepatan alir 3,5 ml/menit; sedangkan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa untuk pemisahan 4 macam vitamin (K, D₂, E asetat dan A palmitat) diperlukan waktu 10 menit, adapun kecepatan alir yang digunakan

adalah 1 ml/menit (lampiran 2 dan 1). Adanya perbedaan diameter partikel pengisi kolom akan menyebabkan perbedaan waktu pemisahan. Semakin kecil diameter partikel maka semakin luas permukaan fasa diam dan semakin kecil pula ruang antar partikel, hal tersebut menaikkan N sampel dan tekanan pengalir sehingga akan memperlama waktu analisis.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan pembahasan di atas dapat disimpulkan bahwa:

1. Fasa gerak campuran metanol-air (95:5) merupakan fasa gerak terbaik untuk analisis vitamin yang larut dalam lemak, karena dapat memisahkan campuran 4 vitamin dengan urutan vitamin K, D₂, E asetat dan A palmitat dengan waktu analisis 10 menit.
2. Analisis serbuk multivitamin dengan fasa gerak campuran metanol-air (95:5) kecepatan alir 1 ml/menit diperoleh pemisahan dengan urutan vitamin K, D₂, E asetat dan A palmitat dengan kadar (dalam %) berturut-turut 93,00 \pm 5,13; 93,33 \pm 6,07; 92,58 \pm 4,78 dan 91,12 \pm 6,41 dihitung dari susunan sebenarnya. Kadar di atas masih memenuhi persyaratan resmi yaitu antara 90,0 dan 110,0%.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap sediaan multivitamin dengan KCTT, terutama perlakuan pendahuluan sebelum dianalisis dengan KCTT.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap sediaan multivitamin dengan KCTT sistem operasi *gradient elution*, sehingga dapat diperoleh hasil pemisahan dengan waktu analisis lebih singkat.

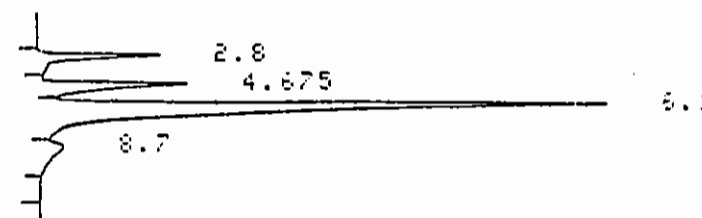
DAFTAR PUSTAKA

- Barnett, S.A., Frick, L.W., and Baine, H.M., 1980, Simultaneous Determination of Vitamins A, D₂ or D₃, and K₁ in infant formulas and Dairy Products by Reversed Phase Liquid Chromatography, *Anal. Chem.*, 52: 610-614.
- Beckett, A.H., Stenlake, J.B., 1976, *Practical Pharmaceutical Chemistry*, 3rd Ed., The Athlone Press of University of London, London.
- Bieri, J.G., 1984, Vitamin E, dalam: R.E. Olson (ed), *Present Knowledge in Nutrition*, 5th E, The Nutrition Foundation, Inc, (Terjemahan: Nasution, A.H. *et al*, 1987, Pengetahuan Gizi Mutakhir: Vitamin), Gramedia, Jakarta.
- Clarke, E.G.C., 1969, *Isolation and Identification of Drugs*, The Pharmaceutical Press, Britain, London.
- Delgado, J.N., 1982, Vitamins and Related Compound, dalam: R.F. Doerge (ed.), *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, pp: 781-808, 8th ed., Philadelphia-Toronto.

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979, *Farmakope Indonesia*, edisi ketiga, Jakarta.
- Dolan, J.W., Gant, J.R., Tanaka, N., Giese, R.W., and Karger, B.L., 1978, Continuous-Flow Automated HPLC Analysis of Fat-Soluble Vitamins in Tablets, *J. of Chromatog. Sci.*, 16: 616-622.
- Done, J.N., Knox, J.H., and Loheac, J., 1974, *Applications of High-Speed Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, London.
- Fraser, D.R., 1984, Vitamin D, dalam: R.E. Olson (Ed), *Present Knowledge in Nutrition*, 5th ed, The Nutrition Foundation, Inc, (Terjemahan: Nasution, A.H. et al, 1978, Pengetahuan Gizi Mutakhir: Vitamin), Gramedia, Jakarta.
- Hamilton, R.J. and Sewell, P.A., 1982, *Introduction to High Performance Liquid Chromatography*, New York.
- Hashmi Manzur-Ul-Haque, 1973, *Assay of Vitamins in Pharmaceutical Preparations*, John Willy & Sons, London.
- Johnson, E.L., and Stevenson, R., 1978, *Basic Liquid Chromatography*, Varian Associates Inc, California.
- La-Roche, F.H., 1970, *Analytical Procedures for the Determination of vitamins in Multivitamin Preparations*, Switzerland.
- Mader, W.J., 1961, Vitamins, dalam: T. Higuchi and E. Brochmann-Hansen (eds.), *Pharmaceutical analysis*, Interscience Publisher, John Willy & Sons, London.
- Olson, J.A., 1984, Vitamin A, dalam: R.E. Olson (ed), *Present Knowledge in Nutrition*, 5th ed, The Nutrition Foundation, Inc, (Terjemahan: Nasution, A.H. et al, 1987, Pengetahuan Gizi Mutakhir: Vitamin), Gramedia, Jakarta.
- Robinson, C.H. and Lawler, M.R., 1982, *Normal and Therapeutic Nutrition*, 16th ed., Macmillan Publishing Co., Inc., New York, London.
- Snyder, L.R., and Kirkland, J.J., 1979, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, London.
- Vanderveen, E., and Vanderveen, J.E., 1980, Vitamins and other Nutrients, dalam: A. Osol (Ed), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.
- Windholz, M., 1983, *The Merck Index*, 10th ed., Merck & Co., New York.

Lampiran 1

Kromatogram pemisahan serbuk multivitamin dengan fasa gerak campuran metanol air (95:5), kecepatan alir 1 ml/menit. Kondisi percobaan: kolom Li-Chrosorb RP-8; volume injeksi 10 μ l; detektor u.v. (panjang gelombang 270 nm)



Lampiran 2

Kromatogram pemisahan 4 vitamin oleh Dolan et al. (1978) fasa gerak campuran metanol air (95:5); kecepatan alir 3,5 ml/menit; kolom LDC RP8 (5 μ m); volume injeksi 10-25 μ l; detektor u.v. panjang gelombang 254 nm.

